

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀池 靖浩

平成 19(2007)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究	2
堀池 靖浩	
II. 分担研究報告	
1. 比色用ドライ試薬の開発	9
小川 涼	
中西 淳	
2. NiフリーSUS 鋼による細管化と高剛性化に関する研究	12
黒田 大介	
3. 無痛針を用いた採血補助装置と診断チップの評価	16
守本 祐司	
4. 診断チップシステム技術、チップ信頼性研究	18
小川 洋輝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

## ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

（主任）研究者 堀池靖浩

## 研究要旨

まず、NiフリーSUS細管を窒素吸収処理と熱処理により高剛性化した外径100 $\mu\text{m}$ 無痛針を試作した。しかし、結晶粒粗大化や座屈により表面性状が良くなく、耐食性や靱性の低下などの問題が明らかになった。ドライ比色用試薬開発ではTG、TC、HDLの3項目のAとBの試薬に対して、トレハロース包含させ凍結乾燥後、水で薬剤に戻す方法を研究し、3項目共通に3-5%のトレハロース濃度が最適と分かった。更に、1ヶ月の特性を調べ劣化が一切認められず、現在数ヶ月の長期保存性を確認した。比色チップは、チップの厚さを13mmから8mm厚にし、血球分離と同時秤量は、分離した血漿を細管流路を高速回転で通過させる方法に改良し、極めて3つの槽に良好に秤量が達成された。そして、ドライ試薬と新開発した全自動計測装置により前臨床検査に入った。被検者から得られた血清検体を用いて、3つの生化学検査項目につき、診断チップと従来検査法により測定して比較分析をおこなった。TGとTCに関しては、非常に高い相関係数が算出されたが、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなく、これは、HDL試薬の粘性が高いため、チップ内貯留槽において血清と十分に混合していなかったと考えられ、現在対策中である。

## 分担研究者

独立行政法人物質・材料研究機構

小川 涼

独立行政法人物質・材料研究機構

中西 淳

鈴鹿工業高等専門学校

黒田 大介

防衛医科大学

守本 祐司

株式会社アドビック

小川 洋輝

一方、現在の生化学検査のほとんどが比色法によって行なわれているが、血漿と試薬の秤量の正確度が測定の信頼性を左右する。更に、マイクロ流路では流れは層流であり、ミキシングには工夫が求められる。従って、本研究は無痛針から採取した極微量血液の分析という基本コンセプトの基で、マイクロチップで比色法を適用した時の上述などの問題を解決した新比色法血液診断チップの開発を目的とする。その目的の一貫として、アレルギーの原因となるNiを排除したNiフリーSUS管を用いた無痛針を開発し、比色法では薬液を用いるが、一旦試薬瓶の封を開けると一ヶ月程度で劣化し、在宅診断を目指しているため、どのような頻度で使われるのかも不明なため、その薬液の長期保存のためドライ化試薬開発も目的とする。本年度は最終年度となるため、無痛針により採取した血液とドライ化試薬を薬液に戻して本比色法チップに導入して、チップ装着から計測まで全自動化された検査装置により測定可能な状況に到達させると共に、前臨床実験に入り、医師に

## A. 研究目的

超高齢化社会の到来に伴い医療費が増大し、その削減には高齢者が元気に過ごすためには予防が重要である。その目的のため、我々は、無痛針から採取した微量血液の分析から在宅で多項目を診断するヘルスケアチップを開発してきた。これは電気化学的手法を用いた。本測定法は血漿などの秤量を必要としないが、校正液を必要とする。

より患者の血液を従来の我々のチップ測定と検査会社と測定を比較し、課題を抽出する作業に入る。そこで、本報告では、(1)NiフリーSUS管の細管化と無痛針の開発、(2)ドライ試薬開発、(3)比色法チップと全自動測定装置の開発、(4)前臨床実験の4部から構成される。

## B. 研究方法

### (1)NiフリーSUS管の細管化と無痛針の開発

(1) NiフリーSUS細管による無痛針  
Fe-24Cr-2Mo (mass%)の鋳塊を高周波真空溶解し、900℃および1000℃で5分再加熱して直径40mmの丸棒材を熱間鍛造により作製後、直径38mmの丸棒材に加工し、冷間鍛造により直径30mm、長さ500mmの丸棒材を作製した。この丸棒材にガンドリル加工を施しパイプ形状とし、焼鈍温度900℃にて細管加工を行い、外径100μm、内径50μmのNiフリーSUS管を作製。

また、窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスを検討した。即ち、NiフリーSUS鋼の細管をN<sub>2</sub>ガス雰囲気中にて1200℃で30分保持した後に急冷し、細管に窒素を吸収させる。次いで、吸収させた窒素を利用して高硬度相を生成させるために1000℃、1100℃および1150℃のそれぞれの温度で10分保持後水冷の熱処理を行なう。

### (2)ドライ比色用試薬の開発

当初、比色法試薬として1液タイプのドライ化を研究していたが、血液検査や臨床検査現場では、一般に2液タイプを用いられ、第一反応試薬Aで遊離の物質消去し、第二反応試薬Bで発色する方法をとっている。そこで、比色法チップでも2液タイプを採用するとともにそのドライ化も研究した。

#### ①1液タイプ

1液タイプとしてトリグリセライドEーテストワコー(和光純薬製)を使用し、トレハロースを添加し、試薬を凍結乾燥し吸光度測定の検量線比較にて、保存温度、期間、添加量、PH影響などの最適化実験をした。トレハロースの添加量実験

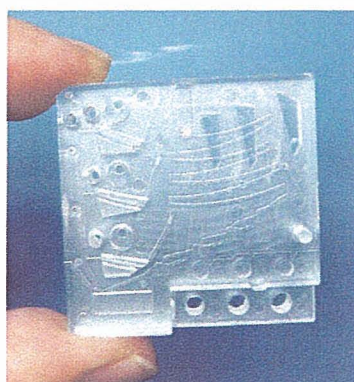
は、1%–20%添加と、添加しないままのものを使い凍結乾燥し液状試薬との吸光度の近似相関から最適濃度を調べた。トレハロースは林原バイオケミカル研究所製の無水トレハロースを使用した。凍結乾燥は、10mm層長のデイスポーサブルセルに1500μlのトレハロース添加試液を入れ、液体窒素を満たした容器に15分入れて瞬間冷凍による予備冷凍の後、-85度にセットした凍結乾燥機で24時間凍結乾燥した。使用時に精製水を添加して元の液状試薬と等量にして実験を行った。

#### ②2液タイプ

2液タイプとしてLタイプワコーHLD-CM、LタイプワコーCHO・M(和光純薬製)を使用した。

### (3)比色法チップと全自動測定装置の開発

図1に示す昨年度試作した比色法による3項目測定用のチップを改良した。本チップは3層構造となっており、これを貼り合わせて一体のチップとする。本チップにより、(1)約6μlの全血より血球と血漿の分離を行い、また抽出された血漿の秤量を行う。(2)多項目検査を考慮して、3項目測定可能とする。(3)上記2種類(ドライ試薬A、B)×3項目(=6種)の液相の試薬の秤量を行う。(4)試薬A・血漿と試薬Bの均質混合を行う。(5)すべての液体(全血、血漿、試薬など)の移送には、チップを回転したときに生起する遠心力により行う。本年度での改良点は、チップの厚さを13mmから8mm厚に薄くしたことと、更に第一層目の血球分離・同時血漿秤量の流路の変更したことである。全自動測定装置は前年度装置を基にチップ挿入



から計測までパソコン制御の全自動化小型装置を日本精工(株)と共同開発した。

図1. 3項目測定用比色法血液診断チップ

(4)前臨床検査：3つの血液検査項目が測定できる診断チップを用い、被検者のTG、TC、HDLを測定した。被検者（健康、高脂血症成人）の血液採取に際しては、インフォームド・コンセントを行う。採血した検体を遠心分離して得た血清の一部（約 500  $\mu$ L）を診断チップ測定用に供し、残りを従来検査法による測定に使用する（SRL社）。

（倫理面への配慮）

本申請研究の初期特性確立への実施は物質・材料研究機構で行われる。本機構では人血の採取、採血具などについて外部の有識者を含む倫理委員会が設立されておりその厳格な規定に基づいて研究を進める。前臨床実験にあたっては、各研究機関のガイドラインに沿った計画を倫理委員会で検討、承認を得た後に、書面でのインフォームド・コンセントを確認する。

## C. 研究結果

### (1)Ni フリーSUS 管の細管化と無痛針の開発

#### ①Ni フリーSUS 鋼細管の表面性状

引抜加工により作製した外径 100  $\mu$ m、内径 50  $\mu$ m の Ni フリーSUS 鋼細管の表面性状および断面の光学顕微鏡写真から、細管表面では引抜加工方向に対して平行な粒界割れが多数認められた。この要因として、引抜加工途中の焼鈍しによる結晶粒粗大化が考えられる。また、細管表面だけでなく細管内面においても結晶粒粗大化およびマイクロ組織の座屈に起因する多数の凹凸が認められた。無痛針として使用できる平滑な表面性状を得ることは現状では容易でないと考えられ、今後はシームレスパイプの製造技術を応用した薄板（箔）からの細管加工プロセスを試みる。

②窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスの検討

1200  $^{\circ}$ C、30 分の窒素吸収処理後に 1000 $^{\circ}$ C、1100  $^{\circ}$ Cおよび 1150  $^{\circ}$ Cのそれぞれの温度で 10 min 保持後水冷の熱処理を施した Ni フリーSUS 鋼のビッカース硬さを図 2 に示す。比較として市販の SUS 鋼製鍼灸針のビッカース硬さもあわせ

て示した。本処理により既存のステンレス鋼製鍼灸針よりも高いビッカース硬さ(Hv 636)を得ることができた

窒素は高温相であるオーステナイト組織には比較的多く固溶することができるが、低温度域で安定なフェライト組織にはほとんど固溶することができない。したがって、窒素吸収処理により高濃度の窒素を固溶させた Ni フリーSUS 鋼を 1200  $^{\circ}$ C以下のフェライト状態の温度で熱処理した場合には、その熱処理温度での固溶限を超えた余剰の窒素は窒化物生成に利用されると考えられる。図 2 において熱処理温度の低下とともにビッカース硬さが増加しているのは、窒素の固溶限低下に起因する窒化物析出量の増加を示唆しており、ビッカース硬さの増加には、析出した窒化物が寄与していると考えられる。しかし、過剰の窒化物の析出は靱性および耐食性の低下要因となる。安全性を確保するために、これらの点についても今後詳細に検討する必要がある。

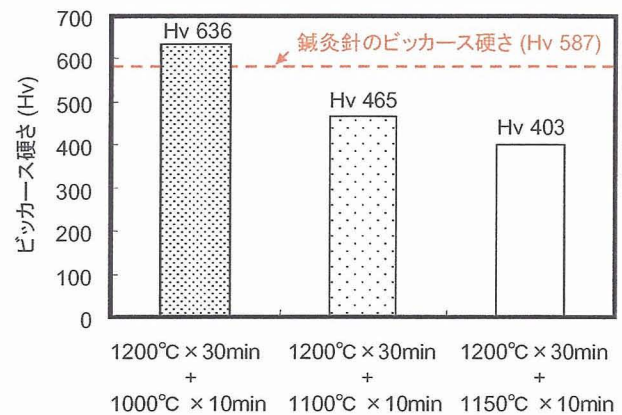


図 2. 種々の熱処理を施した Ni フリーSUS 鋼細管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の硬さ比較

#### ③ 試作した無痛針の特性

高剛性化した外径 100  $\mu$ m、内径 50  $\mu$ m の Ni フリーSUS 鋼の細管を用いて図 3 に示す無痛針の試作を行った。しかし、高剛性化プロセス中に生成した褐色の酸化皮膜が強固に固着し、細管表面においては皮膜の剥離も認められ、さらに刃先性状も良好とは言いがたい。また、細管内部では粒界割れも多数認められ、更に検討を要す。

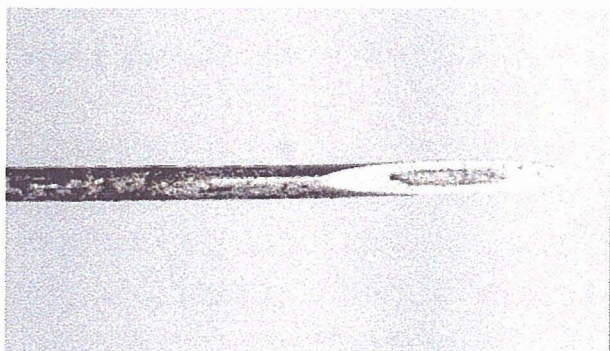


図3. 試作した 304 鋼および Ni フリー SUS 鋼製の無痛針の外観

## (2) ドライ試薬開発

図4は、1液タイプを用いた場合の成人のトリグリセライド正常値(125mg/dl)と異常高値(300mg/dl)時の添加濃度別吸光度を0%、1%、3%、5%、10%、20%のトレハロース濃度変化に対して経時的に調べた結果を示す。液状試薬使用時の吸光度に最も近似した吸光度値は、3-5%添加後凍結乾燥したもので、凍結乾燥による活性の阻害が起こりにくいことが実証され、保存性も優れている。

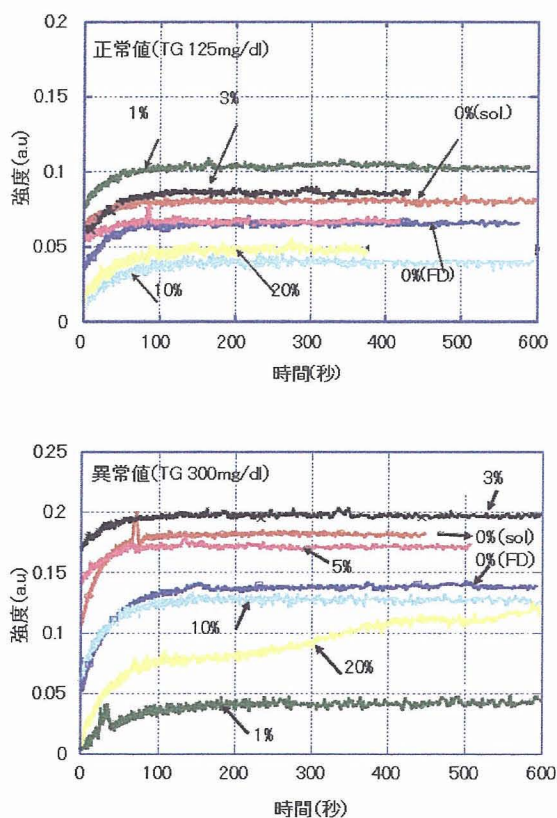


図4. トレハロース添加量別吸光度

凍結乾燥した後、精製水を加えて液状にする凍結乾燥試薬の保存性に対しては、図5液状試薬と違い4℃保存、25℃保存(常温)とも、1ヶ月経過後も検量線に全く影響がなく良好な状態を保った。現在数ヶ月の長期保存性を確認している。従って、ドライ比色試薬として、液状試薬劣らぬと実証された。

2液タイプの脂質3項目についても、3項目についてトレハロースを3-5%添加の凍結乾燥試薬が同様な長期保存性を有することが確認されている。

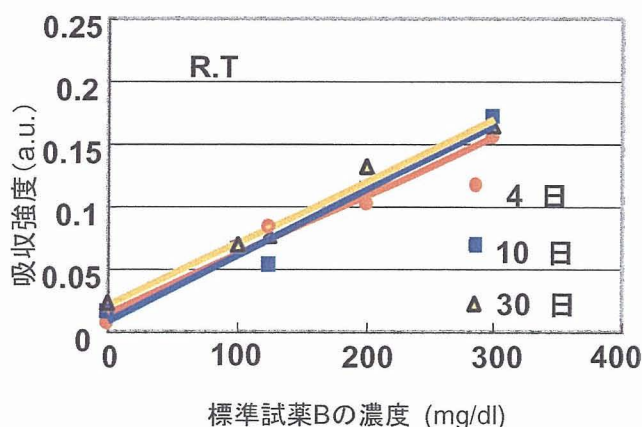


図5. 25℃保存時の濃度勾配の経時変化

## (3) 比色法チップと全自動測定装置の開発

前年度に採用した第一層の血球分離と同時秤量流路はジグザク様であり、加速時に、流路の上部に血漿、下部に血球に分離させようとしたが、8mm厚と薄くし重量を軽くしたにも関わらず、高加速を得るには能力の高いモータが必要であり、装置のコスト高になる。そこで、チップの厚さを13mmから8mm厚にした。更に、血球分離と同時秤量は、ジグザク様の流路で加速時に、流路の上部に血漿、下部に血球に分離させたが、8mm厚でも高加速を得るには能力の高いモータが必要であり、装置のコスト高になる。そこで、図6に示すように、(i)採血後の無痛針モジュールを装着後、(ii)低回転で血液を移動させ、(iii)引き続き血球分離を行い、(iii)高速回転を行い、キャピラリバルブ(細管流路)を通過させ、血漿を3つの秤量槽に移動・秤量させた。本方式の採用により、極めて良好に秤量が達成された。

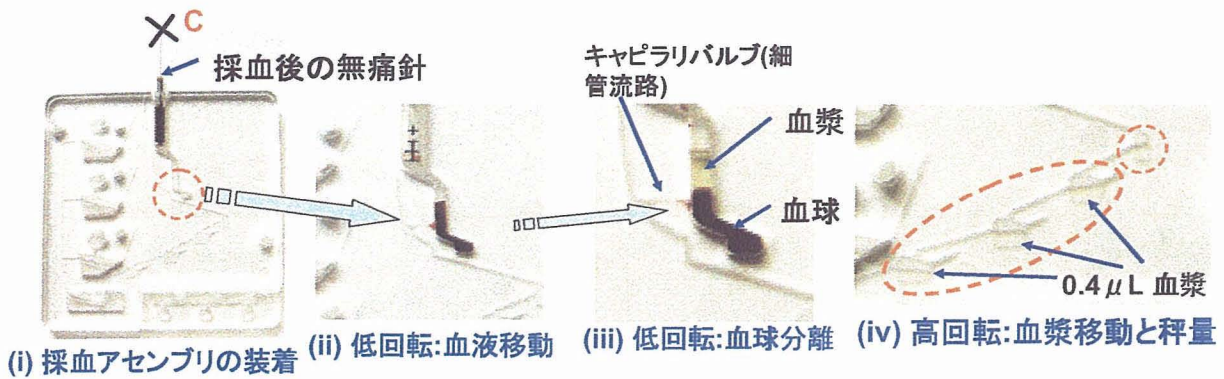


図6. 改良した血球分離・同時秤量プロセス

また、図7に示すように、自動計測装置も新たに開発した。(a)は本体であり、下部に備えた温調器から37℃の空気を送り、恒温化されている。(b)は回転部の詳細を示し、チップは2個載置することができ、チップ構造と光源を変えることにより6項目の計測が可能となる。これらは全てパソコンで制御され計測結果が表示される。

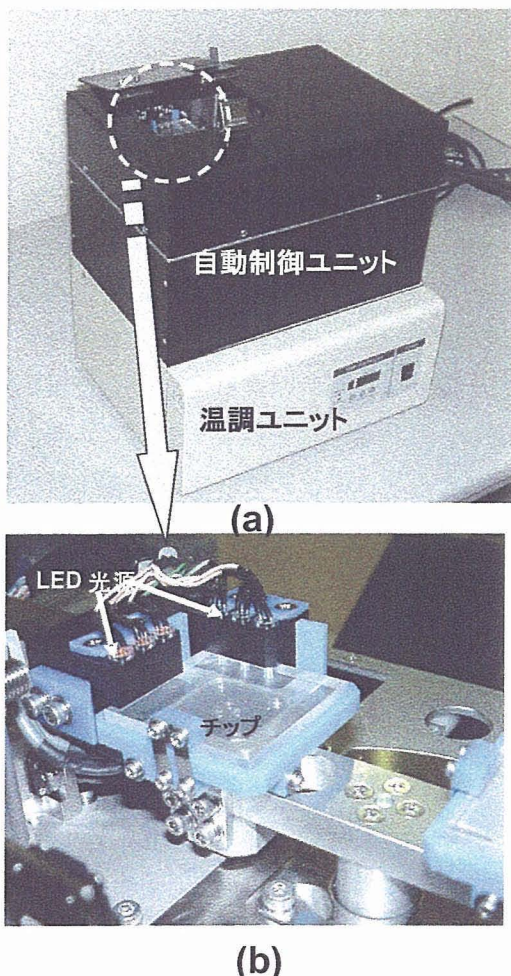


図7. 全自動計測装置(a)、(b)は遠心駆動用ロータの詳細

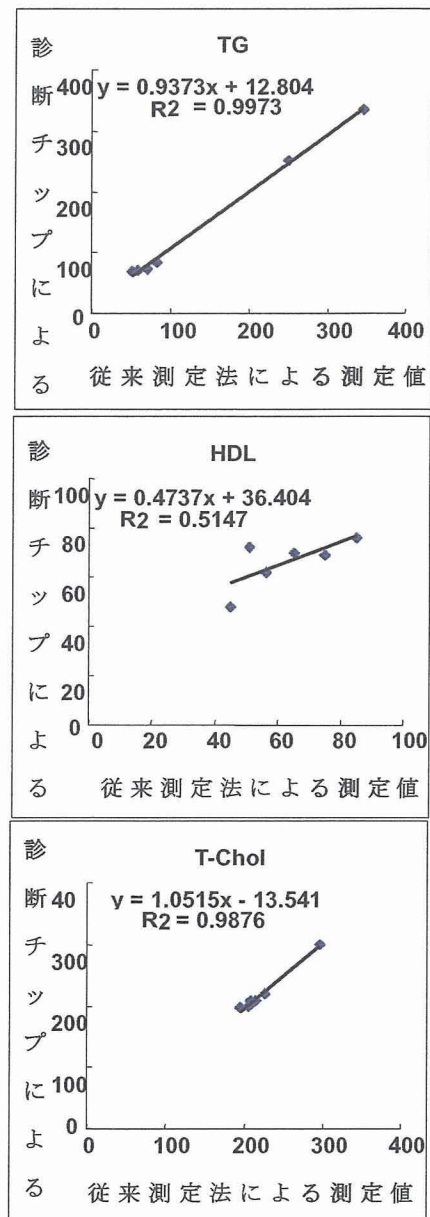


図8. TG、HDL、T-cholの計測値の従来測定法値と本診断チップ測定値との相関関係

#### (4) 前臨床実験

上述の開発・試作した3つの血液検査項目が測定できる診断チップ(図1)を用い、被検者のトリグリセリド(TG)、総コレステロール(TC)、高比重リポタンパクコレステロール(HDL)をドライ試薬を乾燥前と同量の水添加により戻した薬液を用い、更に全自検査装置で測定した。被検者から得られた血清検体を用いて、3つの生化学検査項目につき、診断チップと従来検査法により測定して比較分析をおこない、図8に示す結果を得た。いずれの検査項目に関しても両方法による測定値の間には、高い相関性が認められた。とくに、TGとTCに関しては、非常に高い相関係数が算出され( $r^2 > 0.98$ )、十分に信頼性の高い測定であることが示された。一方、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなかった( $r^2 = 0.51$ )。

今回、各測定項目ともに3~5回計測による測定値平均を採用している。変動指標である変動係数(CV: SD/平均値)を算出したところ、TG、TC、HDLの順に、3.0%、8.6%、10.3%であった。

一方で従来測定法によるそれは(SRL社データ)、3.1%、1.7%、2.0%と報告されている。従って、診断チップによるTG測定に関しては、従来法に匹敵する信頼性を有していることがわかった。

HDL値の変動が大きいことに関しては、いずれの測定においても、手順として血清と2種類の試薬を混合する必要がある、HDL試薬の粘性が高いため、チップ内貯留槽において血清と十分に混合していなかった可能性がある。混合に関する問題は、チップ表面のコーティング処理などにより対応していくことを考えている。

検討すべき問題点はあるものの、臨床前試験によって、本診断チップが誤差・精度に関して実用的には十分な信頼性をもっていることが示された。

#### D. 考察

高齢者の疾病の在宅での予防を目的として、3年間本研究を遂行した。NiフリーSUS管による無痛針では、外径100 $\mu\text{m}$ の針加工には成功した

が、結晶粒粗大化による組織の座屈や耐食性および靱性の低下などの問題も判明した。一方、従来のSUS304を用いた外径150 $\mu\text{m}$ の無痛針を用い、偏光を用いた血管の可視化と皮膚と針間の電位測定から静脈位置が分かり、これらをディスプレイ上で示すことにより、手の表面からも全く痛みを感じずに採血が可能になり、電子採血と呼んでいる。この発展上には自動無痛採血が実現する。診断チップに関しては、比色法では試薬の保存に問題があったが、ドライ化試薬の開発により長期保存化を達成した。また、自動計測装置も開発し、上記3項目中、TGとTCに関しては、検査会社の値と非常に高い相関係数が算出され、十分に信頼性の高い測定であることが示された。一方、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなかったが、これは粘度が高いためミキシング不足と判明しており、その対策案は有している。以上、3年間の本研究課題は殆ど達成されたと考えられる。

#### E. 結果

在宅でできる血液検査診断チップシステムを目指し、NiフリーSUS管による無痛針はまだ課題が残るが、SUS304を用いた無痛針による電子採血、小型自動計測装置を用いての上記3項目の計測技術を確立し、患者の血液を用いた全臨床実験も開始し、検討すべき問題点はあるものの、臨床前試験によって、本診断チップが誤差・精度に関して実用的には十分な信頼性をもっていることを示した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Science.Direct Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation 515(2006) 5167-5171

R.Ogawa, H.Ogawa, A.Oki, S.Hashioka,



Y.Horiike

2. Anal Bioanal Chem Study of water properties in nanospace

Noritake.Kaji, Ryo Ogawa, Akio Oki, Yasuhir  
o.Horiike, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba

386(2006) 759~764

2. 学会発表

Y. Horiike, H. Koda, S-H. Chang, R. Ogawa, S.  
Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa,

“Calorimetric Measurement Clinical Chip For  
Home Medical Diagnosis”,

Proc. of  $\mu$  TAS 2006 Conference, Eds. T.  
Kitamori, et.al., Nov. 5-9, 2006, Tokyo, pp.  
1558-1560 (2006)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 「血液分析装置」、特許第 3847053 号、

公告日：平成 18 年 9 月 1 日

## 比色用ドライ試薬の開発

分担研究者 物質・材料研究機構 小川 涼  
物質・材料研究機構 中西 淳

### 研究要旨

脂質の中性脂肪(TG)、総コレステロール(T-chol)、HDL の 3 項目の比色法診断チップを実現する当たり、市販の液状比色用試薬を本研究の在宅診断適用のコンセプトから求められるドライ化長期保存を研究した。二糖類のトレハロースを約液に包含させ、凍結乾燥し、使用時には乾燥時の水と同量の水を添加して戻す方法を開発した。トレハロース包含濃度と脂質濃度を変え、薬液の性質を変えず、しかも長期保存性に適したトレハロース濃度は 3-5%と判明した。その結果、市販の液状比色用試薬の長期保存性を確立し、現在数ヶ月に至っても特性劣化は見られない。

#### A. 研究目的

現在、血液検査の 90%は比色法で行われ、液状の試薬で検査を行っている現場では、薬能期限の一ヶ月内に使い果たすので問題は無いが、本研究が目標とする在宅使用においては使用頻度、保存期間など不明であり、長期に保存でき、いつ使用しても特性を維持した測定用チップ開発に適したドライ試薬の開発方法を考案する。

#### B. 研究方法

当初、比色法試薬として 1 液タイプのドライ化を研究していたが、血液検査や臨床検査現場では、一般に 2 液タイプを用い、第一反応試薬 A で遊離の物質消去し、第二反応試薬 B で発色する方法をとっている。そこで、比色法チップでも 2 液タイプを採用するとともにそのドライ化も研究した。

##### ① 1 液法

まずトリグリセライドについて比色用検査試薬の中で、混合の必要ないトリグリセライドE-

テストワコー(和光純薬製)を使用し、ドライ化を試みた。液状試薬のままの保存では、10 日後くらいから次第に試薬の中に含まれる酵素の失活が見られるので、細胞乾燥ストレスに効果が認められている二糖類のトレハロースを添加し、試薬を凍結乾燥し吸光度測定の検量線比較にて、保存温度、期間、添加量、PH 影響などの最適化実験をした。トレハロースの添加量実験は、1%-20%添加と、添加しないままのものを使い凍結乾燥し液状試薬との吸光度の近似相関から最適濃度を調べた。トレハロースは林原バイオケミカル研究所製の無水トレハロースを使用した。凍結乾燥は、10mm 層長のディスプレイセルに 1500 $\mu$ l のトレハロース添加試液を入れ、液体窒素を満した容器に 15 分入れて瞬間冷凍による予備冷凍の後、-85 度にセットした凍結乾燥機で 24 時間凍結乾燥した。使用時に精製水を添加して元の液状試薬と等量にして実験を行った。

##### ② 2 液法

1液(全混合)法では、血清：水の比率が非常に大きくなるため、チップ製作を考慮し、血清：試液A：試液B=1:45:15となる2液法で同様の実験を試み、本2液法では、L-タイプワコーHLD-CM, L-タイプワコーCHO・M(和光純薬製)を使用した。

### C. 研究結果

図1は、試薬にトレハロースを添加凍結乾燥したSEMによる形状写真を示す。トレハロースの無添加と比べ、平板状で疎に分布していることが見て取れる。それ故、水溶液に用意に溶ける構造を示している。

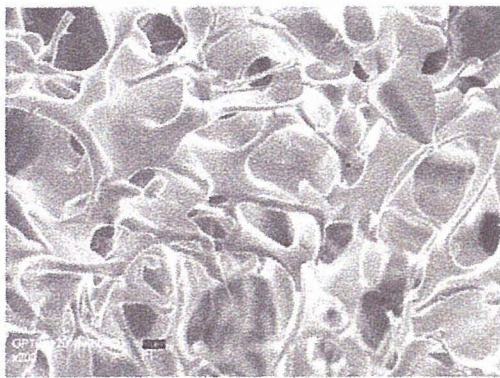


図1. トレハロース添加後凍結乾燥

図2は、成人のトリグリセライド正常値(125mg/dl)と異常高値(300mg/dl)時の添加濃度別吸光度を0%、1%、3%、5%、10%、20%のトレハロース濃度変化に対して経時的に調べた結果を示す。

液状試薬使用時の吸光度に最も近似した吸光度値は、3-5%添加後凍結乾燥したもので、凍結乾燥による活性の阻害が起こりにくいことが実証され、保存性も優れている。また、凍結乾燥試薬に精製水を添加して試液に戻して使用する際に概ねPH6.44-6.47に保たれ酵素活性を阻害せず、至適PH範囲に変化がない。

凍結乾燥した後、精製水を加えて液状にする凍

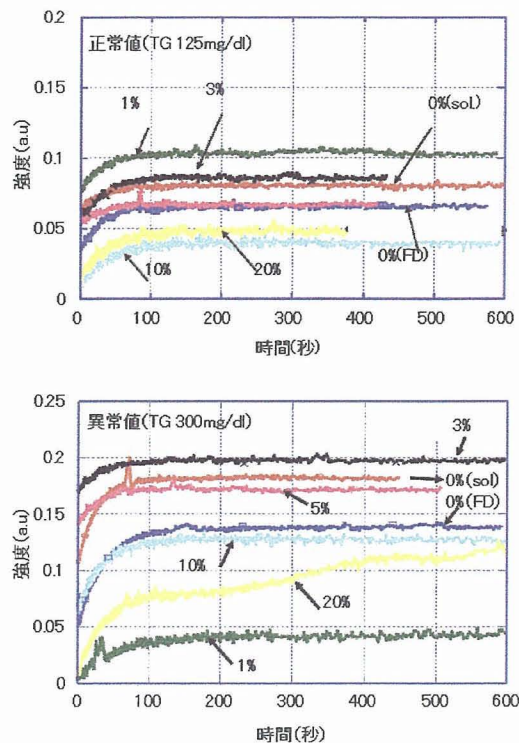


図2. トレハロース添加量別吸光度

結乾燥試薬の保存性に対しては、液状試薬と違い4℃保存、25℃保存(常温)とも、1ヶ月経過後も検量線に全く影響がなく良好な状態を保った。図3は濃度勾配から見た保存性実験の結果を示す。この結果では1ヶ月まで無変質を示しているが、月を経た抜き取り試験でも良好な薬能を示し、現在数ヶ月の長期保存性を確認している。

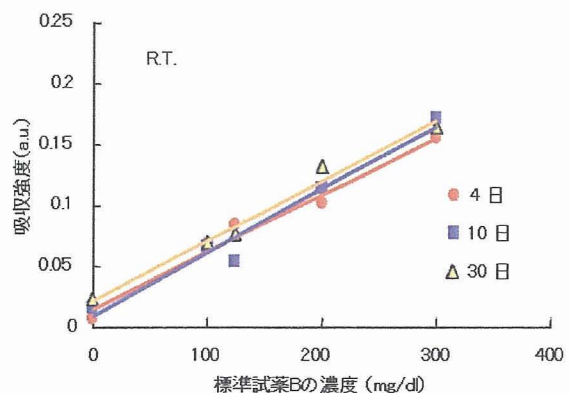


図3. 25℃保存時の濃度勾配の経時変化

2液タイプの脂質3項目について、図4は2液法の脂質3項目について試薬の違いによる検量線を示す。試薬の保存状態の違いによる濃度勾配の検量線から、トレハロース添加の凍結乾燥試薬が

ドライ比色試薬として、液状試薬劣らぬと実証された。

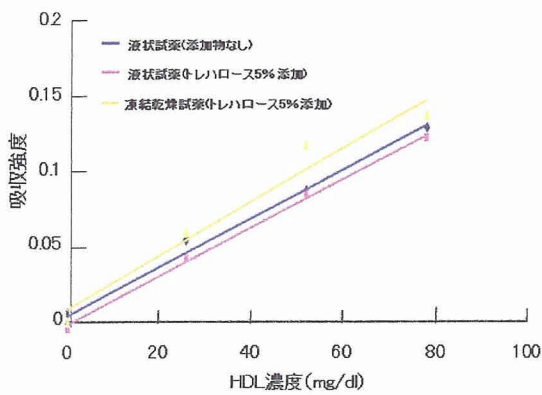


図 4. 25°C保存時の濃度勾配の経時変化

#### D. 健康危険情報

特に無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

R. Ogawa, H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, Y. Horiike, "Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation" Thin Solid Films 515 (2007) pp.5167-5171.

#### 2. 学会発表

Y. Horiike, H. Koda, S-H. Chang, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa, "Calorimetric Measurement Clinical Chip For Home Medical Diagnosis",

Pr Proc. of  $\mu$  TAS 2006 Conference, Eds. T. Kitamori, et.al., Nov. 5-9, 2006, Tokyo, pp. 1558-1560 (2006)

#### 3. 解説

なし。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許出願

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
（総括・分担）研究年度終了報告書Ni フリーSUS 鋼による細管化と高剛性化に関する研究  
（主任又は分担）研究者 黒田大介

## 研究要旨

窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスを検討し、目標とした鍼灸針の硬さ(Hv 587)よりも高い Hv 636 のビッカース硬さを得ることに成功した。また、このプロセスにより高剛性化した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 鋼の細管から無痛針を試作した。しかしながら、①高剛性化前の軟らかいフェライト状態の Ni フリーSUS 鋼を目標寸法へ細管加工することは可能であるが、結晶粒粗大化およびマイクロ組織の座屈に起因する表面性状劣化を改善することは非常に困難である、②針形状への加工は可能であるが、高剛性化プロセス後の表面性状および真直性の改善が必要である、③無痛針として必要な硬さは達成できたが、窒化物析出による耐食性および靱性の低下が懸念される、などの問題が明らかになった。Ni フリーSUS 鋼を無痛針として利用するためには、これら諸問題の解決が必要である。

## A. 研究目的

Ni フリーSUS 管を無痛針として使用するためには高い力学的強度と硬度が必要である。そこで、平成 17 年度は外径 350  $\mu\text{m}$ 、内径 270  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 鋼の細管を用いて窒素吸収処理による高剛性化プロセスを検討した。その結果、窒素吸収処理と冷間加工を組み合わせることにより無痛針として必要な力学的特性および硬さを付与できることを確認した。平成 18 年度は、さらなる高剛性化を目的として窒素吸収処理後に熱処理により窒化物を生成させるプロセスを検討した。また、高剛性化した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 管を用いて無痛針の試作を行った。

## B. 研究方法

## (1) Ni フリーSUS 鋼の細管化

重量 20 kg の Fe-24Cr-2Mo (mass%) の鋳塊を高周波真空溶解炉により溶製した。鋳塊表面の庇を機械加工により可能な限り除去し、900  $^{\circ}\text{C}$  および 1000  $^{\circ}\text{C}$  の温度にて再加熱時間を 5 min とし直径 40 mm の丸棒材を熱間鍛造により作製した。また、旋盤により黒皮除去し、直径 38 mm の丸

棒材に機械加工した。さらに、冷間鍛造により直径 30 mm、長さ 500 mm の丸棒材を作製した。このようにして得られた丸棒材にガンドリル加工を施しパイプ形状とし、焼鈍温度 900 $^{\circ}\text{C}$  にて細管加工を行い、外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 管を作製した。なお、高剛性化プロセスを検討するために、外径 350  $\mu\text{m}$ 、内径 270  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 管を加工途中で若干量サンプリングした。

## (2) 窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスの検討

平成 17 年度は、窒素吸収処理と応力誘起マルテンサイト変態を利用した高剛性化プロセスを検討した。その結果、1200  $^{\circ}\text{C}$  で 30 min 保持後水冷の窒素吸収処理後におよそ 20% の加工ひずみを付与した Ni フリーSUS 管において Hv 529 の高いビッカース硬さが得られた。

鉄鋼材料の硬さを向上させるためには、高硬度相であるマルテンサイト組織あるいは窒化物（析出物）の利用が有効である。前述の応力誘起変態を利用して非熱的にマルテンサイトを得る方法の他に、高温度で一定時間保持することで熱的に

マルテンサイト組織あるいは窒化物を得ることができる。そこで平成 18 年度は、窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化を試みた。高剛性化プロセスの検討には、外径 350  $\mu\text{m}$ 、内径 270  $\mu\text{m}$  の Ni フリー SUS 鋼の細管を使用した。まず、細管をアセトンにて脱脂、洗浄後、図 1 に示す窒素吸収処理装置により  $\text{N}_2$  ガス雰囲気中にて 1200  $^{\circ}\text{C}$  で 30 min 保持した後に急冷し、細管に窒素を吸収させた。次いで、吸収させた窒素を利用して高硬度相を生成させるために 1000  $^{\circ}\text{C}$ 、1100  $^{\circ}\text{C}$  および 1150  $^{\circ}\text{C}$  のそれぞれの温度で 10 min 保持後水冷の熱処理を施した。



図 1 窒素吸収処理装置

種々の処理を行った細管を熱可塑性樹脂に包埋し、マイクロビッカース硬さ試験機により硬さを測定した。付加荷重を 100 g とし、荷重保持時間は 15 s とした。それぞれの処理に対して 10 点の硬さ測定を行い、それらの平均値により硬さを評価した。また、X 線回折装置(XRD)による構成相の同定を行った。XRD による構成相の同定は、Cu-K $\alpha$ 管球を用いて管電圧 40 kV、管電流 20 mA、回折角  $2\theta=30\sim 75^{\circ}$  および回折速度  $2\theta=1^{\circ} \text{min}^{-1}$  の条件で行った。

### (3) 無痛針の試作

高剛性化した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリー SUS 鋼の細管を用いて、分担研究者である(株)アドビックの小川洋輝氏の協力により無痛針

の試作を行った。試作した無痛針の表面性状、刃先形状などについて、既存の 304 鋼製の無痛針と比較、検討した。

## C. 研究結果

### (1) Ni フリー SUS 鋼細管の表面性状

引抜加工により作製した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリー SUS 鋼細管の表面性状および断面の光学顕微鏡写真を図 2 に示す。細管表面では、

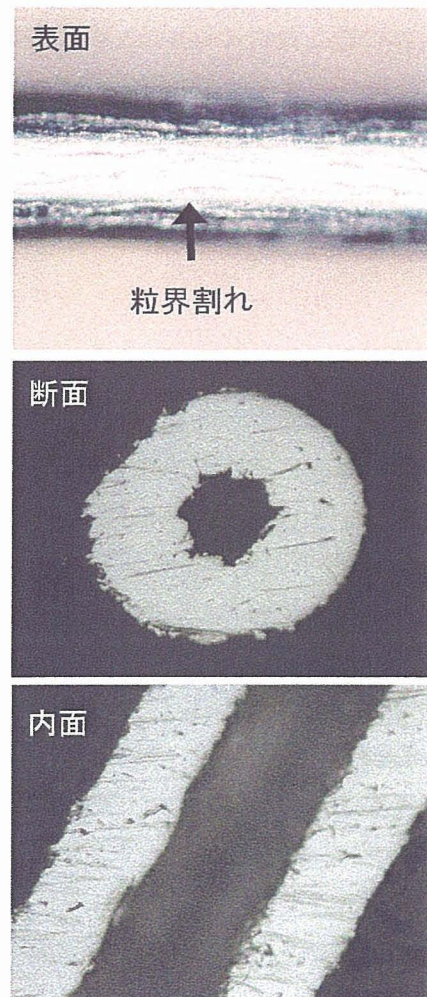


図 2 作製した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリー SUS 鋼細管の表面性状および断面の光学顕微鏡写真

引抜加工方向に対して平行な粒界割れが多数認められた。この粒界割れの 1 つの要因として、引抜加工途中の焼鈍しによる結晶粒粗大化が考えられる。また、断面および内面の光学顕微鏡写真からも明らかなように、細管表面だけでなく細管

内面においても結晶粒粗大化およびマイクロ組織の座屈に起因する多数の凹凸が認められた。本年度までに種々の加工熱処理条件を検討し、加工硬化能の低いフェライト状態の Ni フリーSUS 鋼から目的とする形状の細管を加工することはできた。しかし、無痛針として使用できる平滑な表面性状を得ることは現状の細管加工技術では非常に困難である。今後はシームレスパイプの製造技術を応用した薄板（箔）からの細管加工プロセスを新たに構築する必要がある。

(2) 窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスの検討

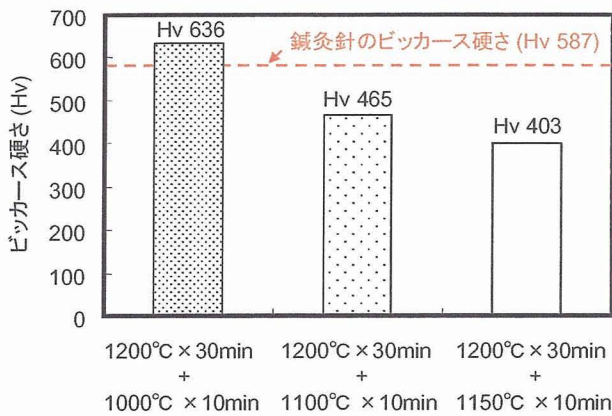


図3 種々の熱処理を施したNiフリーSUS鋼細管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の硬さ比較

1200 °C、30 min の窒素吸収処理後に 1000°C、1100 °C および 1150 °C のそれぞれの温度で 10 min 保持後水冷の熱処理を施した Ni フリーSUS 鋼のビッカース硬さを図 3 に示す。なお、比較として市販のステンレス鋼製鍼灸針のビッカース硬さも図 3 にあわせて示す。窒素吸収処理後に 1000 °C、10 min の熱処理を施した Ni フリーSUS 鋼において、既存のステンレス鋼製鍼灸針よりも高いビッカース硬さ(Hv 636)を得ることができた。また、ビッカース硬さは熱処理温度の増加にともない減少する傾向が認められた。これら細管について XRD による構成相の同定を行ったが、試料寸法が非常に小さいため構成相を同定す

ることはできなかった。

窒素は高温相であるオーステナイト組織には比較的多く固溶することができるが、低温度域で安定なフェライト組織にはほとんど固溶することができない。したがって、窒素吸収処理により高濃度の窒素を固溶させた Ni フリーSUS 鋼を 1200 °C 以下のフェライト状態の温度で熱処理した場合には、その熱処理温度での固溶限を超えた余剰の窒素は窒化物生成に利用されると考えられる。図 3 において熱処理温度の低下とともにビッカース硬さが増加しているのは、窒素の固溶限低下に起因する窒化物析出量の増加を示唆していると考えられる。本高剛性化プロセスでのビッカース硬さの増加には、析出した窒化物が寄与していると考えられる。

本年度に検討した高剛性化プロセスを用いることで、Ni フリーSUS 鋼細管に無痛針として必要な硬さを付与することができると考えられる。しかし、過剰の窒化物の析出は靱性および耐食性の低下要因となる。安全性を確保するために、これらの点についても今後詳細に検討する必要がある。

(3) 試作した無痛針の特性

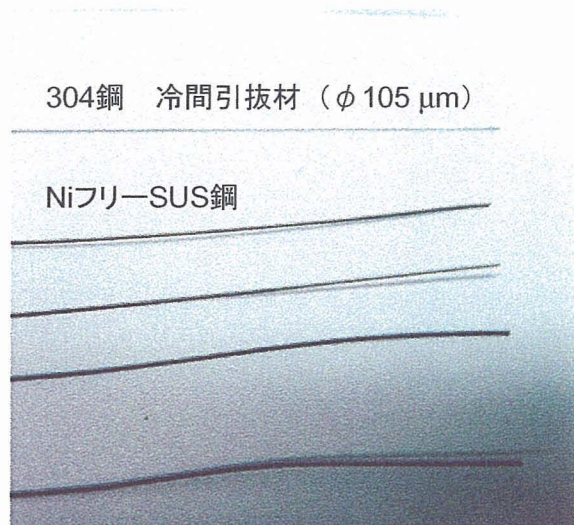


図4 無痛針作製前の 304 鋼および Ni フリーSUS 鋼の外観

無痛針加工前の Ni フリーSUS 鋼細管および

304 鋼の外観写真を図 4 に示す。304 鋼は冷間引抜きにより矯正されているため高い真直性を有している。一方、Ni フリーSUS 鋼においては窒素吸収処理および熱処理による著しい変形が認められた。現状の熱処理時の細管の固定方法では無痛針として必要な真直性および長さを得ることが困難であるため、高温度域においても高い真直性を確保できる細管固定方法および治具の検討、開発が必要である。

高剛性化後に #1500 研磨紙を用いて約 10°で刃先研磨ならびに外側面を電界研磨した Ni フリーSUS 鋼製の無痛針の外観を図 5 に示す。また、比較として同様の手順にて作製した 304 鋼製の無痛針の外観もあわせて示す。図 5 から明らかなように 304 鋼製の無痛針は金属光沢を有しており、管の外側および内側は非常に平滑である。また、刃先形状も良好である。一方、Ni フリーSUS 鋼製の無痛針では高剛性化プロセス中に生成した褐色の酸化皮膜が強固に固着している。細管表面においては皮膜の剥離も認められ、さらに刃先性状も良好とはいえない。また、細管内部では粒界割れも多数認められる。

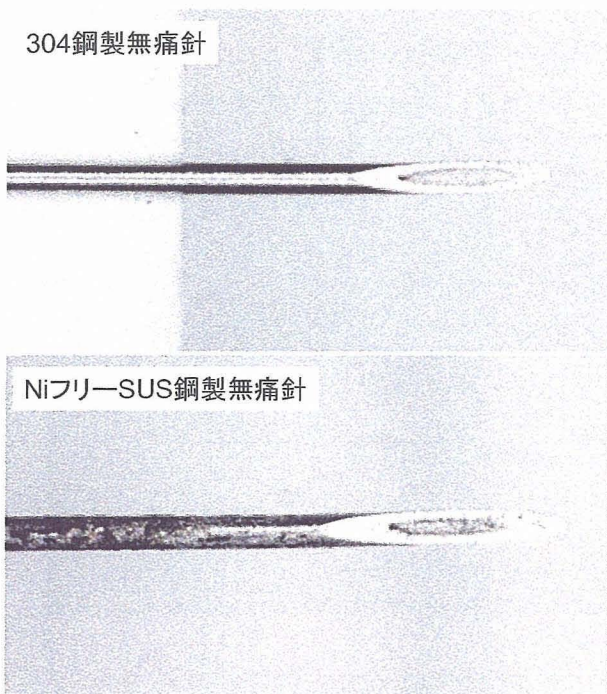


図 5 試作した 304 鋼および Ni フリーSUS 鋼製の無痛針の外観

無痛針における曲がり等の変形は刃先作製のための研磨工程に不都合であるだけでなく、穿刺時に座屈応力を著しく低下させるため所定の穿刺力を維持することができなくなると考えられる。

より真直性の高い Ni フリーSUS 鋼製の無痛針を得るためには、①窒素ガス雰囲気中で冷却できる熱処理設備の導入、②高温度でも真直性を維持しつつ細管を固定できる固定法および治具の開発、③箔材（薄板）からの細管製造プロセスの開発、などについて今後検討する必要がある。

#### D. 健康危険情報

該当なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 黒田大介、檜原高明、黒田秀治、藤原昌樹、堀池靖浩、“無痛針用 Ni フリーステンレス鋼細管の機械的特性”、高等専門学校教育と研究、投稿中。
2. 黒田大介、“Ni フリーステンレス鋼”、金属 (2007) 30-36.
3. S. Fukumoto, T. Mastuo, D. Kuroda and H. Tsubakino, “Micro-Resistance Spot Welding of Nickel Free Austenitic Stainless Steel”, Materials Science Forum, 593-543 (2007) 4081-4086.

##### 2. 学会発表

1. 黒田大介、檜原高明、黒田秀治、藤原昌樹、堀池靖浩、“窒素により高剛性化した無痛針の機械的特性”、日本高専学会第 12 回年会講演会講演論文集(2006)55-56.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
（総括・分担）研究年度終了報告書

無痛針を用いた採血補助装置と診断チップの評価

分担研究者 守本 祐司

研究要旨

試作した3検査項目同時測定診断チップを用いて被検者の血液検査を施行し、測定値精度・誤差に関する検証をおこなった。3つの検査項目のうち、トリグリセリド、総コレステロールについては、信頼性のきわめて高い測定値を得ることができた ( $\gamma^2 > 0.98$ )。一方、高比重リポタンパクコレステロールに関しても、信頼度は実用的レベルに達した ( $\gamma^2 > 0.50$ )。

A. 研究目的

昨年度までに、血液診断チップを試作し、これを用いて高脂血症被検者の中性脂肪値測定を行い、当該チップの有用性を評価したところ、高脂血症治療薬による中性脂肪値の経時的減少を捉えることに成功し、本チップが簡易診断・モニタ法として有用であることが示された。そこで本年度は、本診断チップの前臨床試験をおこなった。すなわち、被検者血液検体を用いて、従来検査法による測定値と比較し、診断チップによる測定法の信頼性につき検証した。

B. 研究方法

B.1. 試作診断チップによる検体測定

分担研究者らの開発・試作した、3つの血液検査項目が測定できる診断チップ（図1）を用い、被検者のトリグリセリド(TG)、総コレステロール(TC)、高比重リポタンパクコレステロール(HDL)を測定した。なお、本チップによる測定法の詳細は、分担研究者である㈱アドビックの小川洋輝氏の報告にある。

被検者（健康、高脂血症成人）の血液採取に際しては、インフォームド・コンセントを行った。採血した検体を遠心分離して得た血清の一部（約500 uL）を診断チップ測定用に供し、残りを従来検査法による測定に使用した（SRL社）。

C. 研究結果

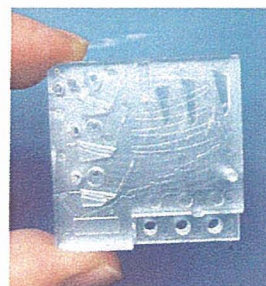


図1 試作した診断チップの外観

C.1. 試作診断チップによる検体測定

被検者から得られた血清検体を用いて、3つの生化学検査項目につき、診断チップと従来検査法により測定して比較分析をおこなった(図2)。いずれの検査項目に関しても両方法による測定値の間には、高い相関性が認められた。とくに、TGとTCに関しては、非常に高い相関係数が算出され ( $\gamma^2 > 0.98$ )、十分に信頼性の高い測定であることが示された。一方、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなかった ( $\gamma^2 = 0.51$ )。

今回、各測定項目ともに3~5回計測による測定値平均を採用している。変動指標である変動係数(CV:SD/平均値)を算出したところ、TG、TC、HDLの順に、3.0%、8.6%、10.3%であった。一方で従来測定法によるそれは(SRL社データ)、3.1%、1.7%、2.0%と報告されている。したがって、診断チップによるTG測定に関しては、従来法に匹敵する信頼性を有していることがわかった。

HDL値の変動が大きいことに関しては、試薬と検体の混合が不十分であることに起因するの

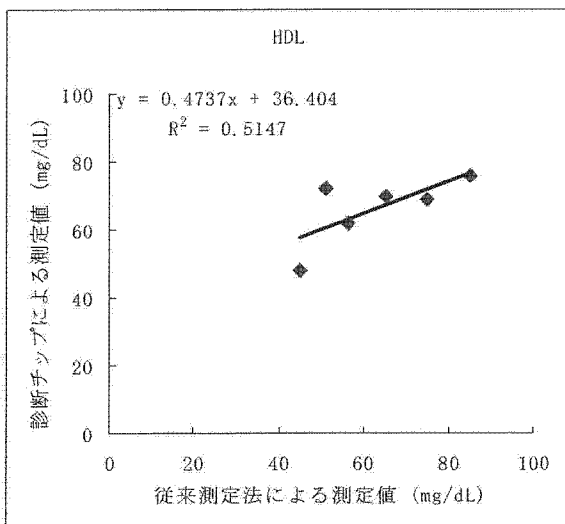
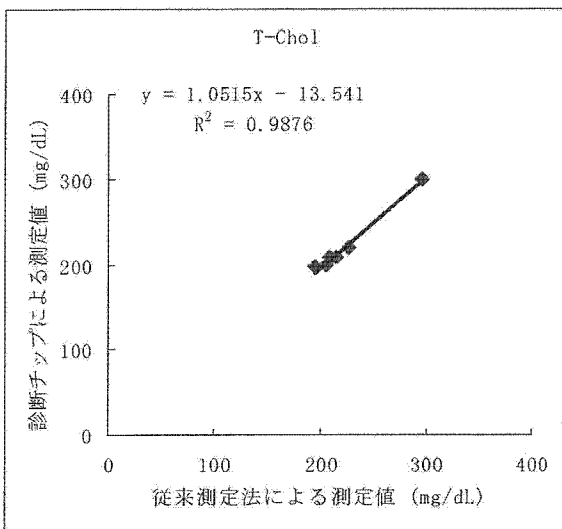
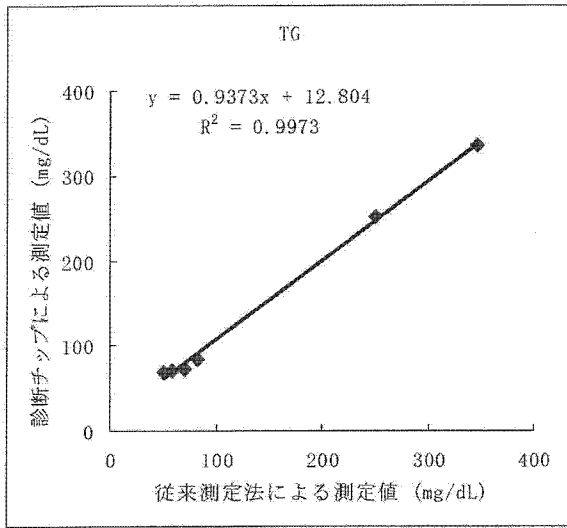


図2 診断チップによる測定値と従来検査法による測定値の比較

して血清と2種類の試薬を混合する必要がある。HDL 試薬の粘性が高いため、チップ内貯留槽において血清と十分に混合していなかった可能性がある。他方、HDL 測定値は絶対値として小さかったため、変動幅(標準偏差)が他2つの検査項目と同じでもCVに換算すると大きくなってしまいうらいがあった。診断チップによるHDL測定値は、上述の要素によって、従来検査法測定値との解離が大きくなったと推定しているが、混合に関する問題は、チップ表面のコーティング処理などにより対応していくことを考えている。

検討すべき問題点はあるものの、臨床前試験によって、本診断チップが誤差・精度に関して実用的には十分な信頼性をもっていることが示された。

#### D. 健康危険情報

とくになし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

別紙3-2参照

##### 2. 学会発表

別紙3-3参照

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 とくになし

かもしれない。いずれの測定においても、手順と

診断チップシステム技術、チップ信頼性研究  
分担研究者 小川 洋輝

## 研究要旨

昨年度試作した3項目測定用チップを評価し、その問題点を抽出した。そしてこの問題点を改良したチップを試作し、血球・血漿分離、血漿秤量、試液、血漿等の移送、秤量、混合などの基本的な性能の評価を行った。また、あわせて試作した自動外部測定装置の評価も行った。

## A. 研究目的

昨年度、設計・試作した3項目測定用チップの問題点の抽出、ならびに改良を行い、その基本的な性能を評価する。また試作した自動外部測定装置についても評価する。

## B. 研究方法

図1に昨年度試作した3項目測定用のチップを示す。本チップは3層構造となっており、これを貼り合わせて一体のチップとしている。また、本チップにより、

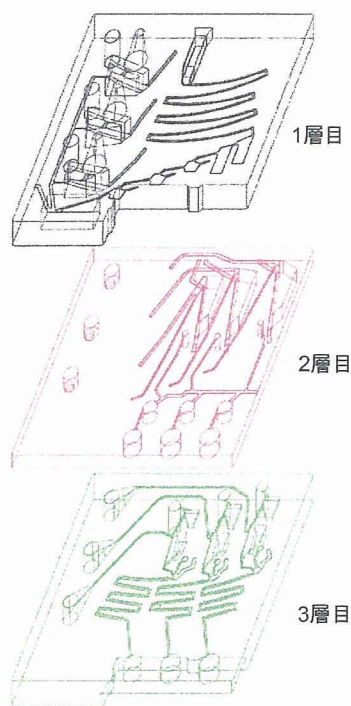
- 1)約6 $\mu$ lの全血より血球と血漿の分離を行い、また抽出された血漿の秤量を行う。
- 2)多項目検査を考慮して、3項目測定可能とする。
- 3)2種類(試薬A、B)×3項目(=6種)の液相の試薬の秤量を行う。
- 4)試薬A・血漿と試薬Bの均質混合を行う。
- 5)すべての液体(全血、血漿、試薬など)の移送には、チップを回転したときに生起する遠心力により行う。

などの機能を盛り込んでいる。

このチップを評価したところ、いくつかの不具合を見出した。すなわち、

- ①第1層において行う血球と血漿の分離、ならびに血漿の秤量の工程において、チップを高加速度で、かつ高回転数で回転させなければならず、外部回転装置に負荷がかかる。
- ②第1の試液を第1の回転前に注入し、また第2

の試液を第2の回転前に注入する必要があり、非常に煩雑である。



(a)分解鳥瞰図

(b)一体鳥瞰図

図1 試作チップの概要

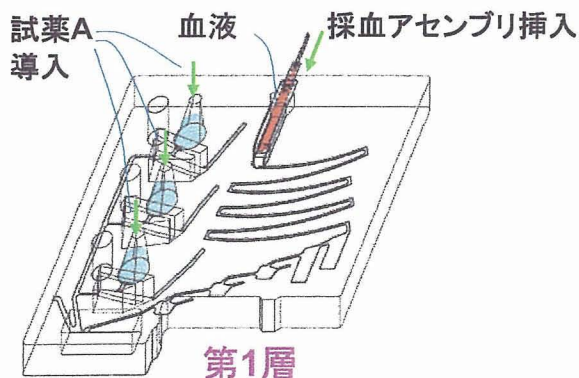


図 2 チップ操作手順 1

③チップの厚みが約 13mm と厚く、重量が大きくコストを低減するためにはより薄いことが望まれる。

①に関しては、図 2 に示すように採血が完了した後に採血モジュールをチップへと挿入し、(同時に第 1 の試液 A も注入) 1600rpm という低い回転数で採血モジュール内である程度全血の血球と血漿の分離を進行させた後に、高加速度でチップの回転数を 6500rpm へと増加させ、右往左往した分離流路の通過途中で血球・血漿分離をより進行させ、血球蓄積領域に血球成分を捕獲し、その下流に配設された 3 箇所の血漿秤量室において  $0.4\mu\text{L}$  ずつ秤量される。(図 3) このような高加速高速回転により、用いるモーターの選択幅を狭め、装置が高価にならざるを得ないという問題の原因となることが判明した。そこで新たな血球・血漿

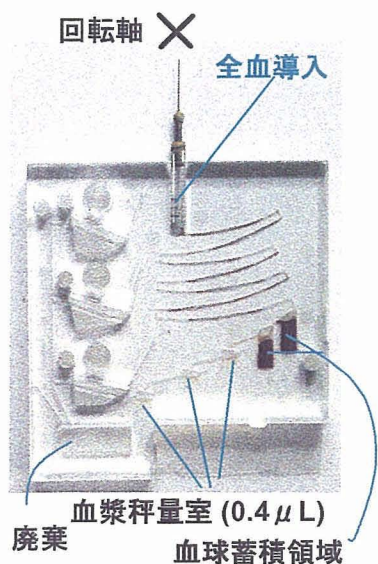


図 3 血球血漿分離と血漿秤量

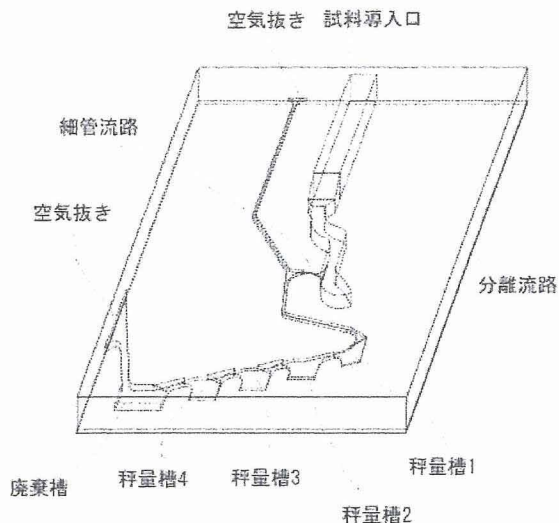


図 4 血球・血漿分離、血漿秤量機構の検討

分離と血漿の秤量機構の検討を行った。図 4 には本検討の際に試作したチップの構造を示している。また図 5 を用い、本チップを用いて血球・血漿分離と血漿秤量を遂行する様子を説明する。

①まず、血液を収容している採血モジュールを試料導入口に装着する。(もちろん直接血液を導入してもよい、同図(a))

②回転軸 C を中心に第 1 の回転数 (R1) でチップを回転する。血液は分離流路の方に移動するが、分離流路途中に接続されている細管流路は通過できない。本分離流路内で血球・血漿分離が進行する。(同図(b))

③ある時間が経過後、分離流路内で血球と血漿の分離がほぼ完了する。(同図(c))

④チップの回転数を第 2 の回転数(R2、 $R2>R1$ )とし、印加遠心力を増加させる。すると分離された上澄みの血漿が細管流路を通過し、遠心加圧方向の下流へと移動していく。(同図(d))

⑤血漿は上流側の秤量槽から満たしていく。各槽の血漿喫水線は回転軸を中心とする同心円で表され、槽の形状、寸法から予め予想できるので、各槽で秤量していることになる。(同図(e))

⑥すべての秤量槽は血漿で満たされ、秤量が完了する。余分の血漿は廃棄層に收容される。分離流路内の血漿のレベルが細管流路のレベルまで下がると(図中矢印)、血漿の流れはもはや無くなる。(同図(f))

(同図(f))